

实用生物技术丛书

动物细胞培养技术 与应用

王捷 主编



化学工业出版社

实用生物技术丛书

动物细胞培养技术与应用

王 捷 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

动物细胞培养技术与应用/王捷主编. —北京: 化学
工业出版社, 2004. 3
(实用生物技术丛书)
ISBN 7-5025-5404-1

I. 动… II. 王… III. 动物-细胞培养 IV. Q954.6-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 033690 号

实用生物技术丛书
动物细胞培养技术与应用

王捷 主编

责任编辑: 梁虹

文字编辑: 周侗

责任校对: 郑捷

封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010)64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京管庄永胜印刷厂印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 14½ 字数 344 千字

2004 年 5 月第 1 版 2004 年 5 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-5404-1/Q·90

定 价: 32.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

序

生物技术 (biotechnology) 又称为生物工程, 是生物科学与工程技术相结合而形成的新学科, 是 20 世纪后半叶迅速发展起来的新技术。

回顾 20 世纪, 生物工程迅速崛起, 已在理论与应用领域取得举世瞩目的成果, 为新物种的形成和新物质的生产开辟了崭新的途径。

展望 21 世纪, 伴随着人类基因组计划取得划时代的成果、基因组学和蛋白质组学的诞生以及生物信息学的迅速发展, 生物工程可望以更快的速度腾飞, 将在世界科技与经济的发展中起支柱与骨干的作用。

生物工程主要包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。

一、基因工程

基因工程又称为重组 DNA 技术, 是通过人工操作, 在分子水平上进行基因重组、改造和转移, 以获得具有新的遗传特性的细胞, 合成人们所需物质的技术过程。1973 年, 科亨 (Cohen) 和波伊尔 (Boyer) 发明了克隆技术, 成功地将外源基因转入大肠杆菌细胞并得以表达, 宣告了基因工程的诞生。其后各种基因工程药物层出不穷, 转基因动物和转基因植物不断涌现, 取得了激荡人心的丰硕成果。

21 世纪基因工程的发展前沿是基因组和功能基因组的研究和开发。1990 年启动的“人类基因组计划”已经于 2003 年 4 月完成, 已经全部阐明了人类染色体 DNA 的约 30 亿对碱基的排列顺序, 接着将继续进行功能基因组的研究, 以阐明其中的 3 万多个基因的序列、位置及其功能。到时人们对疾病的诊断和治疗将在基因水平上进行, 这对提高人体素质、保障人体健康有着划时代的意义。同时还将逐步开展对其他物种的基因组研究, 这将使人们对物种的改良和对所需物质的生产提高到一个前所未有的高度。

二、细胞工程

细胞工程是在细胞水平上改变细胞的遗传特性或通过大规模细胞培养以获得人们所需物质的技术过程。1975 年, 科勒 (Kohler) 和米尔斯坦 (Milstein) 首创杂交瘤技术, 开创了细胞工程的新纪元。细胞融合技术、植物组织培养技术、植物细胞培养技术、动物体细胞克隆技术、杂交瘤细胞培养技术、干细胞培养技术等都在世界范围内发出夺目的光彩。

21 世纪细胞工程发展的重点是动、植物细胞培养技术。动物细胞和植物细胞都可以如同微生物细胞那样, 在人工控制条件的生物反应器中培养, 以获得各种所需的产物。

动物细胞培养主要用于生产激素、疫苗、单克隆抗体、酶、多肽等功能性蛋白质以及皮肤、血管、心脏、大脑、肝、肾、胃、肠等组织器官。在医药工业和医学工程的发展中占有重要的地位。

植物细胞培养主要用于色素、香精、药物、酶等次级代谢物的生产。具有缩短周期、提高产率等显著特点, 不占用耕地, 并且可以不受地理环境和气候条件等的影响, 对于农业产品的工业化生产具有深远的意义。

三、酶工程

酶工程是酶的生产与应用的技术过程。即是通过人工操作, 获得人们所需的酶, 并通过各

种方法使酶发挥其催化功能的技术过程。1969年，固定化氨基酰化酶首次在工业上成功地用于氨基酸的拆分，有力地推动了酶工程的发展。其后，酶分子修饰技术，酶、细胞、原生质体固定化技术，有机介质中酶的催化技术等的发展，为酶的生产和应用开辟了崭新的途径。

21世纪酶工程的发展焦点是新酶的研究与开发应用。随着生物工程的发展，被研究和开发的新酶将越来越多，其中最令人瞩目的有核酸类酶（ribozyme）、抗体酶（abzyme）和端粒酶（telomerase）等。此外，酶的优化生产和高效应用也将进一步发展到前所未有的水平。

四、发酵工程

发酵工程又称为微生物工程，是在人工控制的条件下，通过微生物的生命活动而获得人们所需物质的技术过程。1944年，青霉素液体深层发酵的成功，标志着现代发酵工程时代的到来。随后各种抗生素、氨基酸、核苷酸、维生素等的发酵生产蓬勃发展，使发酵工程进入了全盛时期。

21世纪发酵工程的发展策略是利用DNA重组技术获得更加符合人们需要的优良的微生物细胞，并进行全面的代谢调节控制。由于传统的从自然界直接获得的微生物或者经过筛选、诱变得到的微生物已难以满足人们的需要，21世纪用于发酵工程的微生物大多数都是经过基因重组、改造、转移而获得的具有优良特性的工程菌。利用这些工程菌进行发酵，需要进行一系列的代谢调节控制，才能获得理想的发酵效果。故此，21世纪的发酵工程将根据代谢工程的理论对优良的工程菌进行全面的代谢调控，以获得人们需要的各种代谢产物。

由此可见，生物工程不仅对于物种的改良和进化具有极其重大的意义，而且在医药、食品、工业、农业、环保、能源等方面有重要的应用价值，将对人类的健康、长寿和世界科技、经济、社会的发展产生深远的影响。

为了加速我国生物工程的发展，使生物技术的研究成果尽快产业化，加速生物技术在各个领域的应用，特组织有关专家学者编写《实用生物技术丛书》。

本丛书的编写宗旨是以实用生物技术为特色，以生物技术在医药、食品、轻工、化工、环保、能源等领域的应用为主线，理论与实际紧密结合，推动生物技术和产业化的进程。为此，本丛书不是面面俱到地介绍各种生物技术的基本理论和基本知识，而是有重点地选择介绍一些实用性强、前景看好，与产业化关系密切的生物技术的原理、方法及其应用的最新研究进展与发展趋势。本丛书由下列各分册组成：

- 《基因克隆技术在制药中的应用》
- 《细胞融合技术与应用》
- 《植物细胞培养技术与应用》
- 《动物细胞培养技术与应用》
- 《酶的生产与应用》
- 《固态发酵技术与应用》
- 《非热杀菌技术与应用》

各分册均由有实践经验的在职专家撰写，在简明介绍基本理论和基本知识的基础上，重点阐述技术的原理和方法及其应用的最新研究进展和发展趋势。期望本丛书的出版对我国生物技术研究、开发和产业化能够起到积极的推动作用。

郭 勇

2003年5月于广州

前 言

从动物细胞培养技术问世到大规模细胞培养生产的生物技术产品涌现的近 100 年时间内，动物细胞培养技术经历了曲折的发展过程。在 19 世纪末期，于血浆或腹水中维持组织块生长数天至数周的实验标志着动物细胞培养技术的诞生。但由于受当时细胞培养液质量和无菌条件的限制，细胞培养实验的成功率很低。1907 年，Ross Harrison 首次报道神经元细胞可在体外培养达 30 d，表明细胞的正常功能可在体外维持。20 世纪 40 年代抗生素的应用是细胞培养历史的一个里程碑。添加抗生素可减少培养基受污染的机会；同时无菌操作技术也逐渐成熟。Earle 和 Eagle 对细胞体外培养条件的广泛分析是大规模细胞培养技术最重要的突破。1955 年 Eagle 报道采用一种化学成分确定的培养基即 DMEM 培养基可以代替当时普遍使用的生物体液进行细胞培养。随后，适合细胞体外培养的培养基研究成功和能悬浮培养的无限繁殖细胞系的建立，对动物细胞的大规模培养起到巨大的推动作用。

1954 年美国微生物学家索尔克利用原代培养猴肾细胞制备的脊髓灰质炎病毒疫苗首先进入工业化规模生产过程；1962 年 Capstick 等人成功地进行 BHK 细胞（幼年仓鼠肾细胞）类似微生物细胞的悬浮培养，标志着动物细胞培养工业化应用的突破性发展。以较安全的细胞株（WI-38 和 MRC-5）取代原代培养的猴肾细胞，促进了人用病毒性疫苗 [麻疹疫苗（1963 年）、狂犬病疫苗（1964 年）、流行性腮腺炎疫苗（1969 年）和风疹疫苗（1969 年）] 进入临床应用。动物细胞培养技术生产的最初产品为病毒性疫苗，第一个采用动物细胞培养技术生产的天然蛋白药物是人干扰素。在 20 世纪 70 年代后期，Kohler 和 Milstein 建立的骨髓瘤细胞与淋巴细胞融合的杂交瘤细胞技术对动物细胞的工业化应用产生了第二次促进作用。10 年后重组蛋白技术引入制药工业，通过基因工程技术，可使靶 DNA 稳定转染哺乳动物细胞进行表达。动物细胞表达生产的第一个非天然蛋白是用于心肌梗死溶栓治疗的组织纤溶酶原激活剂（tPA）。动物细胞生产重组 tPA 的成功为许多其他重要的重组蛋白生产开辟了新的途径。

本书作为《实用生物技术丛书》一部分，全面系统地介绍了动物细胞培养技术的最新理论和应用。主要内容包括：动物细胞培养技术的基本理论，动物细胞培养的历史、应用和发展方向，单克隆抗体技术，无血清培养基与生物反应器，外源基因在动物细胞中的表达及产物纯化技术，培养过程中生物污染物的控制，培养细胞凋亡的预防，动物细胞培养技术在疫苗制备和组织工程研究中的应用，同时介绍了动物细胞培养在 SARS 研究中的初步应用，抗原提呈细胞——树突状细胞的分离诱导纯化技术。全书内容紧密结合实际应用，具有较高的学术价值。是从事动物细胞工程技术研究、生产和管理人员的重要工具书；也可供生物技术专业研究生和本科生参考。

本书共分九章。第一章、第二章、第四章、第七章和第九章由广州军区广州总医院医学实验中心王捷教授编写；第三章由广州军区广州总医院医学实验中心免疫实验室夏冰博士编写；第五章和第八章由华南理工大学生物工程系韩双艳博士编写；第六章由广州军区广州总医院医学实验中心蛋白质工程实验室武婕博士编写。本书的作者均是长期在一线从事相关研究的专家，尽管在编写过程中部分作者参与了抗 SARS 的科技攻关，但他们仍然通过攻

孜不倦的努力，结合最新研究进展，完成了该书的撰写工作。我对于他们在百忙中所给予的支持表示真诚的感谢。

在本书的编写过程中，得到华南理工大学生物工程系郭勇教授的大力支持和指导；华南理工大学生物工程系的杜红延博士和王征硕士为本书的完成和修订付出了辛勤的劳动；第一军医大学免疫学教研室吴军博士为第九章编写提供了精制的图片和研究结果；此外，本书的编写还得到广州军区广州总医院各级领导的关怀和指导以及广州军区广州总医院医学实验中心全体人员的支持，在此表示衷心的感谢。我同时感谢化学工业出版社的有关领导和老师对本书能够顺利形成和出版所给予的支持和所付出的努力。

由于作者水平所限，书中不足之处，请读者谅解并提出宝贵意见。

王 捷

2004年3月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 动物细胞培养技术的发展历史	1
一、动物细胞培养技术应用的起始阶段	1
二、动物细胞培养技术的应用过程	2
三、动物细胞培养技术的产业化阶段	3
第二节 动物细胞培养技术的实际应用	4
一、生产天然药用蛋白	4
二、基因重组蛋白的临床应用	5
三、制备单克隆抗体	6
四、对环境和动物保护的作用	6
五、新药研发	7
第三节 动物细胞培养技术的发展方向	8
一、临床生物治疗	8
二、疫苗研制	8
三、药理检测模型	9
参考文献	9
第二章 动物细胞培养技术的基本理论	10
第一节 动物细胞的生长特征	11
一、贴附生长	11
二、生长的接触抑制及密度依赖性	12
第二节 动物细胞的增殖过程	12
一、潜伏期	13
二、对数生长期	13
三、稳定期	13
四、衰亡期	14
第三节 动物细胞体外培养的生长方式和条件	14
一、培养细胞的生长方式	14
二、细胞培养的条件	14
三、微载体培养技术在动物细胞培养中的应用	22
第四节 细胞系建立、保存和鉴定	24
一、基本概念	24
二、建立细胞系(株)的档案	25
三、细胞系的鉴定	25
四、细胞系(株)的保藏	26
第五节 动物细胞培养的放大技术与生物反应器	26

一、细胞培养规模的放大	26
二、动物细胞培养用生物反应器	27
三、培养过程监控	30
四、结语	31
参考文献	31
第三章 动物细胞培养在单克隆抗体制备中的应用	33
第一节 杂交瘤技术的基本原理和过程	33
一、小鼠体系	33
二、大鼠体系	45
三、人体系	47
第二节 杂交瘤细胞高密度无血清悬浮培养技术	49
一、影响杂交瘤细胞体外培养的主要因素	49
二、动物细胞大规模培养操作方法	52
三、动物细胞培养生物反应器	54
四、动物细胞的微囊化培养	55
五、杂交瘤细胞大规模培养生产抗体	56
第三节 单克隆抗体的分离纯化	57
一、鼠腹水中单克隆抗体的初步纯化	57
二、细胞培养液中单克隆抗体的浓缩	58
三、亲和色谱纯化抗体	59
四、离子交换色谱纯化抗体	62
五、凝胶过滤色谱纯化抗体	66
六、高纯度单克隆抗体纯化方案设计	68
第四节 单克隆抗体的应用	69
一、体外应用	69
二、体内应用	71
参考文献	78
第四章 外源基因在动物细胞中的表达与产物纯化	80
第一节 动物宿主细胞	80
一、BHK-21 细胞	81
二、CHO-K1 细胞	81
三、C127 细胞	81
四、MDCK 细胞	81
五、Namalwa 细胞	81
六、Vero 细胞	81
七、鼠骨髓瘤细胞	82
八、COS 细胞	82
第二节 动物细胞的基因转染技术	82
一、光穿孔法	83
二、冲击波法	84

三、基因枪法	84
四、电穿孔法	84
五、磷酸钙共沉淀法	84
六、脂质体法	84
七、抗体转染法	85
八、其他	85
第三节 蛋白表达条件的优化	85
一、表达载体与宿主细胞	85
二、改变重组工程细胞特性, 延长培养周期	93
三、重组工程细胞培养工艺的优化	95
第四节 动物细胞表达的基因重组蛋白的分离纯化	96
一、动物细胞生产的基因重组蛋白的性质	97
二、下游纯化过程简介	97
三、下游纯化工艺的设计	98
四、细胞分离	99
五、精制步骤	105
六、问题	106
第五节 动物细胞培养和纯化过程中生物污染物的控制	106
一、去除杂蛋白	106
二、去除微生物, 保持无菌状态	107
参考文献	111
第五章 动物细胞培养法生产疫苗	112
第一节 疫苗发展历程	112
一、疫苗的历史	112
二、疫苗的分类	112
三、人用疫苗的发展趋势	113
四、兽用疫苗现状	115
五、疫苗接种的意义	116
六、目前国内应用疫苗的种类和简介	117
第二节 疫苗制品纯化技术	119
一、细胞破碎	119
二、离心沉降技术	120
三、膜分离技术	121
四、凝胶过滤技术	122
五、离子交换色谱	123
六、疫苗制备过程中纯化技术的实际应用	124
第三节 动物细胞培养技术在疫苗生产中的应用	125
一、森林脑炎疫苗制造	125
二、流行性乙型脑炎灭活疫苗制造	127
三、口服脊髓灰质炎活疫苗制造	129

四、人用浓缩狂犬病疫苗制造·····	130
五、冻干麻疹活疫苗制造·····	131
六、冻干流行性腮腺炎活疫苗制造·····	134
七、细胞生物反应器微载体培养草鱼出血病疫苗·····	136
八、二次细胞技术在疫苗生产上的应用·····	136
九、同批次细胞基质收获甲肝和麻疹病毒制备联合疫苗的方法·····	137
十、同时感染法制备甲肝(LA ₁)减毒活疫苗·····	137
十一、管道化生产CHO细胞重组乙肝疫苗·····	138
参考文献·····	138
第六章 动物细胞培养法生产基因重组蛋白药物·····	140
第一节 概述·····	140
第二节 哺乳动物细胞培养生产基因重组蛋白药物·····	142
一、基因重组蛋白药物在哺乳动物细胞表达的基本步骤·····	143
二、哺乳动物细胞的大规模培养·····	144
三、用哺乳动物细胞生产的基因重组蛋白药物·····	150
第三节 昆虫细胞生产基因重组蛋白药物·····	153
一、常用的昆虫细胞系·····	154
二、昆虫细胞系中常用的表达载体·····	154
三、稳定转染昆虫细胞系的繁殖和表达·····	154
四、稳定转染细胞表达外源蛋白·····	155
参考文献·····	155
第七章 动物细胞培养在组织工程中的应用·····	157
第一节 组织工程化生物反应器——人工肝·····	157
一、肝细胞的来源·····	158
二、生物人工肝系统中反应器·····	159
第二节 皮肤组织工程细胞和组织工程化皮肤·····	162
一、皮肤组织工程细胞·····	162
二、组织工程化皮肤·····	164
三、展望·····	167
第三节 组织工程技术在骨缺损修复中的应用·····	167
一、骨组织工程研究进展·····	168
二、骨髓基质干细胞的定向诱导分化·····	169
三、细胞型骨组织工程技术修复骨缺损·····	171
参考文献·····	172
第八章 细胞培养技术在SARS研究中的应用·····	174
一、SARS病毒简介·····	174
二、细胞培养在SARS病毒鉴定和检测中的应用·····	174
三、组织细胞培养在抗SARS药物研制中的应用·····	175
参考文献·····	177
第九章 树突状细胞的制备技术·····	178

一、外周血树突状细胞的分离·····	178
二、小鼠髓源性树突状细胞的制备·····	182
三、从小鼠胸腺前体细胞诱生树突状细胞·····	185
四、人树突状细胞的体外诱导分化·····	189
五、从纯化的 CD14 ⁺ 单核细胞诱生树突状细胞 ·····	194
六、用于肿瘤免疫治疗的血源人树突状细胞制备·····	201
参考文献·····	205
附录 生物制品生产用动物细胞制备及检定规程·····	208

第一章 绪 论

人类在数千年前就在日常生活中应用生物技术，如烘烤面包、酿造啤酒和通过发酵制备乳酪进行食物的保存等。在 20 世纪初，“生物工程”一词开始在乳品工业中应用，此时的“生物工程”指在生物过程中产品的实际制备。动物细胞技术 (cytotechnology) 是生物工程的一个部分，动物细胞在体外的增殖可以大规模地生产多种生物制品。动物细胞技术的定义为：在体外培养扩增动物细胞，作为生物制品的生产和医学检测的工具。从 1962 年起动物细胞培养规模开始扩大，发展至今已成为生物学、医学研究和应用中广泛采用的技术方法。利用动物细胞培养生产具有重要医用价值的酶、生长因子、疫苗和单抗等，已成为医药生物高技术产业的重要部分，占世界生物高技术产品市场份额的 50%。大量资料表明，生物技术药物是当前新药开发的重要领域，生物制药工业是未来制药工业的重要门类，期间将有数百种生物技术新药上市。美国预测的几种畅销基因工程药物 2000 年全球销售额 EPO 大于 30 亿美元，G-CSF 大于 20 亿美元，HGH、IFN、UK 均大于 10 亿美元，胰岛素和降钙素大于 5 亿美元。

第一节 动物细胞培养技术的发展历史

动物细胞培养技术起源于 19 世纪的某些胚胎学技术。1885 年，德国人 W Roux 把鸡胚髓板在温热的盐水中维持其存活了 10 d，被认为是组织体外培养的萌芽实验。1887 年，Arnold 把白细胞收集在盛有盐水的小碟子里，并观察到这些白细胞在运动，并存活了一段时间。由于当时的培养基不理想，因此实验难以重复，难以证明所培养的是否是真正存活的健康的组织和细胞。直到 1907 年实验胚胎学家 R Harrison 将蛙胚神经管区的一片组织植入蛙的淋巴液凝块中，这片组织不但存活了几个星期，而且从培养的细胞中长出了轴突，从而证明了动物组织（细胞）在离体条件下培养是完全可行的。在此基础上，1912 年 Carrel 不但发现鸡胚浸出液对于某些细胞的生长具有很强的促进效应，还把无菌技术方面的知识带到了组织培养技术中来。他在完全没有抗生素的条件下竟使鸡胚心脏的细胞维持生存了 34 年，先后传代 3400 次，令人信服地证明动物细胞有可能在体外无限地生长。由于 R Harrison 和 Carrel 的卓越成就，细胞培养从此开始了迅猛的发展，并成为生物工程特别是细胞工程中一项重要的基础技术。图 1.1 为 20 世纪初的细胞培养装置。

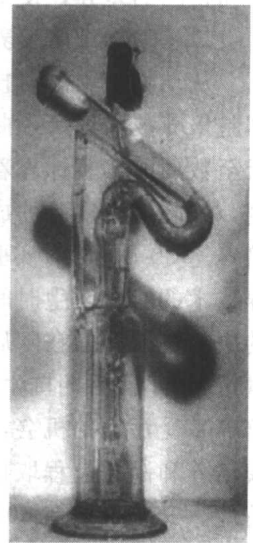


图 1.1 20 世纪初的细胞培养装置

一、动物细胞培养技术应用的起始阶段

1797 年，英国医师 Edward Jenner 发现挤奶的妇女因为时常接触牛痘而不患天花。随后他将牛痘水痘液接种儿童，使儿童免得天花。此举在西方世界为免疫学科奠定了基础。在随后数十年中，法国化学家路易斯巴斯德的研究表明接触微量修饰或灭活的传染因子可激发针对某些疾病的免疫反应。在 1883 年，第一个儿童免疫接种狂犬病疫苗，标志着一种新型工业——疫苗工业的诞生。

为大力发展各类保护性疫苗，人们开始广泛寻找引起各种传染病的致病因子以及减毒方法。由于病毒和细菌感染是人类感染性疾病的最常见原因，因此分离作为疫苗的细菌和病毒成为热点。在疫苗工业的早期，普遍使用人工病毒感染的兔和牛作为狂犬病和天花疫苗的来源，而细菌或毒素作为细菌疫苗的基础。在1920~1950年间，抗伤寒、白喉、结核、破伤风、霍乱、百日咳、流行性感胃和黄热病的病毒和细菌疫苗相继出现。

在20世纪50年代初，动物细胞培养生产病毒的技术问世，即在一个含特殊培养基的特别容器中进行动物细胞的大规模培养，最终导致病毒在细胞中增殖。培养技术的突破是动物细胞大规模培养的真正开始。动物细胞技术制备的病毒性疫苗分为减毒疫苗（可能含有活病毒但无致病性的变异病毒）和灭活病毒疫苗。在动物细胞技术早期应用的30年中，疫苗挽救了数以百万计的人和动物的生命。在1950~1985年间，细胞工程等技术的发展使脊髓灰质炎、麻疹、流行性腮腺炎、德国麻疹、乙型肝炎和带状疱疹病毒疫苗问世，与此同时许多兽用疫苗也得到快速发展。

早期动物细胞技术制备的病毒性疫苗一般采用原代细胞培养方法进行。例如在制备抗脊髓灰质炎病毒疫苗过程中，先从猴肾分离细胞，体外培养细胞数天后感染病毒，进行病毒的增殖扩增。随着实验动物数量的增加，病毒产量相应提高。该生产方法需要消耗大量的动物，操作程序复杂，生产成本高，难于满足大量的要求。动物细胞培养技术的快速发展使病毒疫苗的制备发生革命性变化，提高了疫苗的生产效率和减少了动物使用数量。而真正的突破性发展是无限增殖细胞系的建立，即从动物体分离的细胞可在体外特定培养条件下进行扩增，得到足量细胞进行病毒制备。其中一些细胞克隆能够无限增殖，这些具有无限增殖能力的细胞由相同的细胞类型组成，形成细胞系，因此依赖动物器官补充细胞的方法被逐步摒除。因为细胞系具有安全和重复性好等特点，所制备的病毒性疫苗质量得到保证，同时消除了动物间的差异，使来自动物的传染性致病因子污染的可能性减少。

二、动物细胞培养技术的应用过程

从动物细胞培养技术的问世到大量细胞培养生产的产品出现的近100年时间内，动物细胞培养技术经历了曲折的发展过程。在19世纪末期，在血浆或腹水中维持组织块生长数天至数周的实验标志着动物细胞培养技术的诞生。由于当时培养液营养质量和无菌条件的限制，细胞培养实验的成功率很低。1907年，R Harrison首次报道神经元细胞可在体外维持培养达30d，同时实验表明细胞的正常功能可在体外维持，因此1907年被普遍视为细胞培养技术的实际诞生时间。Harrison及后续研究人员发现严格的无菌条件是细胞培养实验成功的决定性因素。在随后的40余年中，细胞培养的发展受限于缺乏严格的无菌消毒手段。20世纪40年代后期抗生素的发展是细胞培养历史的另外一个里程碑。添加抗生素可减轻复杂培养基受污染的机会，同时无菌技术也逐渐成熟。此后10余年间，主要在动物细胞的大规模培养和制备过程取得明显进展，如举世闻名的HeLa细胞系的建立及其在体外的良好生长特性。其实，早在1928年，Maitland就建立利用组织培养繁殖病毒的简便技术。直到1949年Enders等人发现脊髓灰质炎病毒可在HeLa细胞中培养，通过体外繁殖病毒进行疫苗的生产，是动物细胞技术应用历史上的伟大里程碑。

Earle和Eagle对细胞体外培养条件的系统研究分析是大规模细胞培养技术最重要的突破。1955年Eagle报道采用一种化学成分确定的培养基即DMEM培养基（Eagle最低条件培养基）在添加血清的基础上，可以代替当时普遍使用的生物体液进行细胞培养。适合细胞体外培养的培养基研究成功和能悬浮培养的无限繁殖细胞系的建立对动物细胞的大规模培养

起到巨大的推动作用。

三、动物细胞培养技术的产业化阶段

1954年美国微生物学家索尔克利用原代培养猴肾细胞制备的脊髓灰质炎病毒疫苗首先进入工业化规模生产。由于原代培养的猴肾细胞呈贴壁生长特性，实际的疫苗产量有限。1962年Capstick等人成功地进行BHK细胞（幼年仓鼠肾细胞）的悬浮培养，标志着动物细胞培养工业化应用的突破性发展。随着无限

稳定细胞系的建立，更加促进动物细胞大规模培养技术的发展。从哺乳动物细胞生产生物产品的历史来看，其生物安全性受到普遍关注。传代细胞系（CCL）与原代细胞相比，具有许多优点，如生长快速、细胞类型均一、成本低、无病原体污染问题等。CCL在生物学特性上与肿瘤细胞有许多相似之处，部分是从肿瘤细胞衍生而来，它们可能含有可传播的致癌因子或其本身就具有某种程度的潜在致癌性。由于缺乏有效的技术手段来排除这种可能，CCL

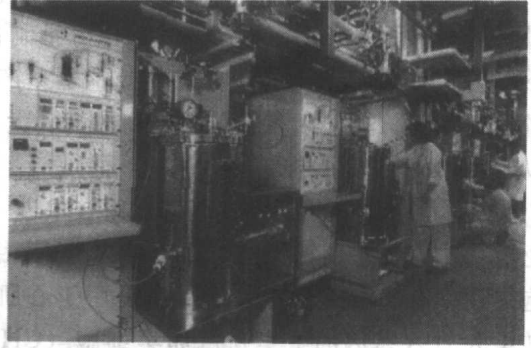


图 1.2 动物细胞大规模培养装置

在很长时期内只被用于兽用疫苗的制备。如在1000 L搅拌式生物反应器中悬浮培养BHK21细胞，生产牛用口蹄疫病毒疫苗。截至1975年，疫苗的年产量超过 10^6 L，生产规模扩大到10 000 L的反应器。动物细胞大规模培养装置如图1.2。20世纪60年代初期建立的二倍体细胞具有CCL的许多优点，如细胞类型均一、无污染等，然而由于同样理论上的原因，缺乏安全评估手段，对推定的致癌因子不能提供否定性证据，在1962年，二倍体细胞也被排除在生产用细胞之外。大约10年后，大量研究工作证实了二倍体细胞的安全性，第一批二倍体细胞（WI-38和MRC-5）终于获准用于生产脊髓灰质炎灭活疫苗，而此时仍保持着对CCL使用的禁令。

以较安全的细胞株（WI-38和MRC-5）取代原代培养的猴肾细胞，促进了人用病毒性疫苗的生产并进入临床应用，如麻疹疫苗（1963年）、狂犬病疫苗（1964年）、流行性腮腺炎疫苗（1969年）和风疹疫苗（1969年）。所有这些疫苗的生产以批量方式进行，即细胞培养至高密度后再感染相应的病毒，病毒在细胞内大量增殖后，弃除细胞并收获病毒。动物细胞培养技术生产的最初产品为疫苗，随之是“天然”蛋白药物产品。由于动物细胞培养分泌的药用产品的浓度过低，从生产成本考虑，不可能进行大规模制备。

近30年来，细胞生物学、病毒学和分子遗传学的发展使人们对肿瘤发生的相关因素有了相当深入的了解，在CCL中发现了一些潜在致癌因子，包括细胞DNA（如活化癌基因）、内源性致癌病毒（如逆转录病毒）、转化蛋白（如T抗原）以及完整细胞本身。要确认CCL缺乏所有的潜在致癌因子是相当困难的，但随着纯化技术的发展和检测手段的进步，有方法证明在成品中没有不可接受水平的DNA和蛋白质以及致癌因子。这最终导致了20世纪80年代CCL获准用于生产。

第一个在Namalwa细胞（人淋巴滤泡细胞）中生产的天然产品为人源干扰素，采用8000 L搅拌式生物反应器生产，培养产物年产量达数百万升。20世纪70年代后期，Kohler和Milstein建立的骨髓瘤细胞与淋巴细胞融合的杂交瘤细胞技术对动物细胞的工业化应用产生了第二次促进作用。通过将产生抗体的淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合，形成的杂交瘤细胞可

以特异分泌针对已知抗原的单克隆抗体。

杂交瘤技术生产的单克隆抗体促进了抗体的诊断应用。与传统的动物免疫制备抗体技术相比,单克隆抗体的最大优点是不含小鼠非特性免疫球蛋白,抗体批间差异小。将杂交瘤细胞接种 3000 只小鼠腹腔或用 1000 L 反应器发酵培养 10 次可以制备 1 kg 抗体。虽然杂交瘤细胞呈贴壁黏附生长,但采用细颈培养瓶、滚筒培养瓶,尤其是中空纤维反应器培养,可以明显提高杂交瘤细胞培养生长密度,从而使抗体产率增高,同时降低抗体粗提液中杂蛋白含量。另一方面,小规模生产方式可以分批制备不同类型的单克隆抗体。1985 年,英国 Celltech 公司使用 1000 L 气升式生物反应器生产单克隆抗体,培养持续时间大约 400 d,抗体产量在细胞生长静止期和衰减期达到最高。大多数抗体可在 10 000 L 的搅拌式生物反应器中以分批和流加灌注方式培养生产。

20 世纪 80 年代初期,基因重组技术进一步推动了动物细胞培养技术在制药工业中的广泛应用。通过基因转染技术,使外源 DNA 稳定转染哺乳动物细胞并进行蛋白表达。动物细胞表达生产的第一个非天然蛋白是用于心肌梗死溶栓治疗的组织纤溶酶原激活剂(tPA)。转染人 tPA 基因的中华仓鼠卵巢细胞(CHO)在生物反应器中扩增培养,tPA 产率可达 50 mg/(10^9 CHO 细胞·d)或更高,并于 1986 年成为首个获准进入临床应用的重组蛋白药物。1989 年 Genentech 公司和 Karl Thomae 博士使用 10 000 L 反应器大规模分批培养表达 tPA 的 CHO 细胞获得成功,动物细胞生产重组 tPA 的成功为许多其他重要的重组蛋白生产开辟了新的途径。第二个进入临床应用的重组蛋白是调控红细胞分化成熟的红细胞生成素(EPO)。1989 年,Amgen 公司采用分段滚瓶培养 EPO 基因转染的 CHO 细胞进行 EPO 生产。与此同时用于血友病治疗的药用凝血蛋白生产也得到快速发展。20 世纪 80 年代后期,由于受艾滋病的血源传播的影响,从捐赠血液中纯化凝血蛋白的难度和风险增加,从而加速基因重组凝血因子的发展进程。重组凝血因子 VIIb、VIII 和抗血栓因子 III 等产品目前大部分采用工业化批量生产。1993 年拜耳公司获准生产的重组凝血因子 VIII 是少数应用灌注培养法生产的重组蛋白。与分批培养相比,表达凝血因子 VIII 的 BHK21 细胞在搅拌式反应器中灌注培养的细胞密度提高 30 倍。因为产率不受密度影响,因此凝血因子 VIII 的产量也增加 30 倍。100~150 L 的小规模灌注培养的产量甚至高于 5000~15 000 L 反应器的分批生产。

第二节 动物细胞培养技术的实际应用

一、生产天然药用蛋白

细胞培养技术生产天然蛋白首先是获得能够合成所需蛋白的均一细胞系。但该类细胞的蛋白产率通常很低,培养成本高和工作量大,从而限制了动物细胞技术在蛋白生产的应用,仅仅用于制备干扰素和尿激酶等少数蛋白和疫苗。20 世纪 70 年代初期的两次科学革命是动物细胞技术的工业化扩大应用的主要转折点。首先是杂交瘤技术的建立,即将产生特异抗体的小鼠脾 B 淋巴细胞和具备无限增殖能力的小鼠骨髓瘤细胞发生融合得到杂交瘤细胞。该技术实现了稳定、高质和大量生产特异抗体的梦想。遗传工程或重组 DNA 技术推动了动物细胞技术的加速发展。重组 DNA 技术通过将编码相关蛋白质信息的基因转入细胞,进行大规模的增殖。该技术使先前不能或不能大量生产的蛋白质得到大规模制备,同时也可高效生产修饰或改性蛋白质。而基因转移技术有助于筛选适合工业化生产的安全高效的特定细胞系。

杂交瘤技术和重组 DNA 技术促进了动物细胞技术在疫苗和治疗诊断药物研制中的应

用。目前治疗药物包括心血管疾病（组织纤溶酶原激活剂，tPA），囊性纤维化（DNases），贫血（红细胞生成素，EPO），血友病（凝血因子Ⅷ和Ⅸ），癌和病毒感染（干扰素）及侏儒症（人生长激素，hGH）；诊断药物包括许多诊断和治疗用单克隆抗体。疫苗也逐渐地使用遗传基因修饰的动物细胞进行生产。以上表明动物细胞技术对动物和人类的健康产生了巨大影响。事实上动物细胞技术生产的产品占现代生物技术产品销售收入的50%以上。

二、基因重组蛋白的临床应用

动物细胞培养技术提高了生物制品的安全性。既往使用的动物源性生物制品可引起不必要的过敏反应或严重副作用。例如脊髓灰质炎疫苗的SV40污染、流感疫苗的鸡变态反应蛋白污染、肝炎病毒（HBV）或艾滋病毒（HIV）污染的血制品和从人脑垂体制备生长激素引发疯牛病。虽然动物细胞技术生产的产品并不能保证绝对安全，但大量的实际应用显示通过改良制备工艺过程使可能出现的污染控制在最小范围。由于使用生物学性质优良的细胞系，动物细胞技术应用中病原体的污染危险减少。而以往采用在动物体内生产疫苗过程存在明显的危险性，因为来自供体的病原体可能被传播。目前，由于病毒可在生物学性质优良的细胞系中增殖，结合系列的纯化过程将显著减少病原体污染的危险。

应用遗传工程手段可在改良细胞培养情况下生产特定病毒蛋白，这些蛋白质可用于疾病的预防免疫接种。其优点是无需处理完整和有传染性的病毒。而从供体血提取抗血友病因子Ⅷ和Ⅸ等血制品普遍存在病毒污染的可能性，如乙型肝炎病毒、HIV病毒可通过血液制品进行传染。应用遗传基因修饰的动物细胞可制备更加安全和无传染性的抗血友病因子Ⅷ和Ⅸ，减少感染的概率。

由于天然动物体来源的生物制品产量低，使其在临床应用受限。目前只要明确蛋白的编码基因，即可利用编码基因转染细胞进行目的基因的表达，转染细胞在体外大量扩增使目的蛋白产量提高。基因工程技术迅速推进动物细胞技术工业的发展。例如在人体内含量甚微的细胞因子及拮抗因子陆续应用动物细胞工程技术进行制备。用于侏儒症治疗的人生长激素一般从死人的脑垂体中提取，从数以百计的脑垂体获取的生长激素仅够一个病人的治疗用量，而且存在传染疯牛病的风险。而现在可从基因修饰的动物细胞或大肠杆菌中大量制备人生长激素，同时产品更加安全。过去从2500 L再生障碍性贫血病人的尿中仅能提取微量的EPO供实验研究使用，而重组DNA技术的出现使EPO的大量制备变成可能，通过基因修饰动物细胞生产的大量EPO已成功用于无数肾性贫血患者的治疗。组织纤溶酶原激活剂（tPA）用于肺栓塞和心肌梗死的治疗。tPA原先并不能大量制备，而利用动物细胞培养技术生产的tPA为肺栓塞和心肌梗死的临床治疗提供了充足的tPA。重组tPA与人体内天然tPA生物学性质相似，至今全世界超过500 000名患者接受重组tPA的治疗。临床多中心研究资料表明tPA溶栓治疗效果显著，提高患者生存率和再灌注率。与其他的溶栓药物和介入方法相比，tPA治疗的副作用较低。许多血友病患者接受抗血友病因子Ⅷ或Ⅸ的治疗。血浆来源的抗血友病因子Ⅷ或Ⅸ量少，存在被艾滋病、肝炎和未知病毒污染的危险。而采用动物细胞技术可以大量制备不含病毒的抗血友病因子Ⅷ或Ⅸ。此外，一些接受传统的抗血友病因子Ⅷ或Ⅸ治疗的患者可产生相应的药物抑制反应，此时可选用凝血因子Ⅶ治疗。凝血因子Ⅶ在体内含量甚微，因此不可能从血液中得到足量的凝血因子Ⅶ用于出现抑制反应的血友病患者治疗。现代生物技术则可以利用重组DNA技术，在哺乳动物细胞中表达合成凝血因子Ⅶ。

人体免疫系统将异源的治疗性蛋白作为外源蛋白并诱发免疫反应。首次应用异源治疗性蛋白后，如再次使用可能逐步诱发强烈的免疫反应，如细菌来源的链激酶（治疗心肌梗死）、